

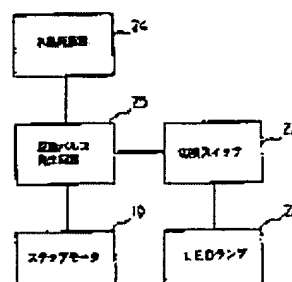
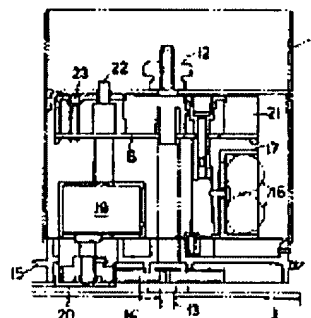
**ROTARY DRUM DRIVING DEVICE FOR SELF-RECORDER**

**Patent number:** JP1010125  
**Publication date:** 1989-01-13  
**Inventor:** IGARASHI JUNSAKU  
**Applicant:** OTA KEIKI SEISAKUSHO:KK  
**Classification:**  
- international: G01D15/24  
- european:  
**Application number:** JP19870165483 19870703  
**Priority number(s):**

**Abstract of JP1010125**

**PURPOSE:**To easily set one cycle of a drum through switch operation by driving the rotary drum of a self-recorder by a stepping motor.

**CONSTITUTION:**The driving device for the rotary drum 2 has a battery case 17, an IC substrate 18, and the stepping motor 19 integrally on a fitting plate 15 move rotatable around a column 13, and a small-diameter gear 20 is rotated by this stepping motor 19 to revolve on its axis and also rotates around the gear 14. A crystal oscillator 24 and a driving pulse generating circuit 25 are mounted on the IC substrate 18 and the circuit 25 generates a pulse signal at specific intervals corresponding to a 1-day, 7-day, or 31-day period set with a changeover switch 22, thereby driving the stepping motor 19 with the signal. When the changeover switch 22 is slid to a specific position to select a specific period, a selected LED 23 illuminates to indicate an in-operation state.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-10125

(43) 公開日 平成10年(1998) 1月16日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 2 1		G 0 1 N 33/543	5 2 1
	5 0 1			5 0 1 H

審査請求 有 請求項の数16 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平9-48175	(71) 出願人	597029860 シントロン バイオリサーチ, インコーポ レーテッド アメリカ合衆国 92008 カリフォルニア 州 カールズバッド, ローカー アベニュー ウエスト 2774番地
(22) 出願日	平成9年(1997) 3月3日	(72) 発明者	ジン ポー リー アメリカ合衆国 92061 カリフォルニア 州 ボーウェイ, グレン サークル 13150番地
(31) 優先権主張番号	08/641163	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)
(32) 優先日	1996年5月9日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 全血の一工程アッセイ方法および装置

(57) 【要約】

本発明は、細胞および細胞成分を含み、または含む疑いのある流体試験サンプルの対象の被分析物のアッセイにおいて使用するための装置から成る。本発明の装置は各々、試験サンプルの非細胞画分から細胞画分を分離するための親水性細胞トラップを含む。非細胞画分は、装置の多孔性、吸収性または吸湿性膜を通して移動し、それらの膜は、染料ゾーン、試験ゾーンおよび対照ゾーンを含む少なくとも3つの別々のゾーンにおいて試薬が含浸されている。対照ゾーンにおける明確に目に見えるパターン formation は、試験が適正に行われたことを示し、試験ゾーンにおける目に見えるパターンの形成または相対強度は、試験サンプルにおける被分析物の有無を示す。本発明の装置は、特に、赤血球および他の細胞を血液から予め分離することなく、また液相での反射率を測定する必要なく、全血におけるリガンドをアッセイするのに適している。本発明のアッセイを行うための方法も開示する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 繊維から繊維までの孔の有効サイズが試験サンプル中の全ての細胞の予想される最小直径より小である少なくとも3層の重複する繊維から成る親水性細胞トラップ；細胞トラップと流体連絡する親水性のサンプル導入膜；サンプル導入膜と流体連絡する染料含浸膜；対照ゾーンおよび少なくとも1つの試験ゾーンを有する、染料含浸膜と流体連絡する試薬含浸膜；被分析物に結合することができるか、または試験ゾーンでの固定化リガンドへの結合を被分析物と競合することができる、染料含浸膜における少なくとも1つの可溶染料標識リガンド；被分析物または標識リガンドに結合することができる、試験ゾーンにおける固定化リガンド；標識リガンドの少なくとも1つに結合することができる、対照ゾーンにおける固定化リガンド；を含み、サンプル導入膜、染料含浸膜および試薬含浸膜の各々が疎水性基板上に位置する、細胞および細胞成分を含み、対象の被分析物を含む疑いのある流体試験サンプルのアッセイ装置。

【請求項2】 少なくとも1つの層における繊維から繊維までの孔の有効サイズが8 $\mu$ を超えないことを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項3】 少なくとも1つの層における繊維から繊維までの孔の有効サイズが2 $\mu$ を超えないことを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項4】 細胞トラップがサンプル導入膜の上に位置することを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項5】 サンプル導入膜の孔の有効サイズが細胞トラップのものと同しいか、それより大きいことを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項6】 細胞トラップが、セルロース誘導体、ナイロン、繊維ガラスおよびそれらの組み合わせから成る群から選択される親水性材料で構成されることを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項7】 サンプル導入膜が、セルロース誘導体、ナイロン、繊維ガラスおよびそれらの組み合わせから成る群から選択される親水性材料で構成されることを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項8】 さらに、前記装置の細胞トラップおよび膜を覆う疎水性カバーを含み、該カバーが細胞トラップの上に位置する窓を有することを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項9】 基板が細片であることを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項10】 基板およびカバーが生体適合性の固体で形成され、該基板およびカバーが前記装置の細胞トラップおよび膜を囲むハウジングを形成することを特徴とする請求項8に記載の装置。

【請求項11】 さらに、試薬含浸膜と流体連絡するように位置する吸収性材料を含むことを特徴とする請求項10に記載の装置。

【請求項12】 前記装置の細胞トラップおよび膜が、試験サンプルが細胞トラップからサンプル導入膜、染料含浸膜および試薬含浸膜を通して流動するように細片に配置されることを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項13】 染料含浸膜の標識が、酵素、リボソーム、赤血球ゴースト、ポリマーマイクロカプセル、着色ポリマー粒子（ラテックス）から成る群から選択され、好ましくは、金属含有化合物のゾルを含むことを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項14】 標識がコロイド状の金であることを特徴とする請求項13に記載の装置。

【請求項15】 リガンドが、抗原、抗体、ホルモン、酵素、ペプチド、タンパク質、核酸、オリゴヌクレオチド、糖タンパク質、炭水化物、多糖およびそれらの組み合わせから成る群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の装置。

【請求項16】 請求項1に記載の装置の細胞トラップに試験サンプルを適用し；対照ゾーンのパターンを検出し；そして、試験ゾーンのパターンを検出する；ことを含み、その際、対照ゾーンにおける検出可能なパターンが適正なアッセイが行われたことを示し、試験ゾーンにおける検出可能なパターンが試験サンプル中の被分析物の有無を示す、細胞および細胞成分を含み、対象の被分析物を含む疑いのある流体試験サンプルのアッセイ方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生物学的流体サンプルをアッセイするための方法および装置に関する。特に、本発明は、アッセイを行う前にサンプルから細胞画分を分離する必要のない、全血サンプル中の被分析物を検出するための方法および装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】種々の体液のアッセイで使用するため、試薬を含浸させた毛管膜の開発により、使用が簡単で、比較的迅速に（例えば、10分以内に）結果が得られる試験装置を生産することが可能になった。おそらく、そのような装置の最も一般的な応用は、ヒトの妊娠指示薬としてのヒト絨毛性ゴナドトロピンの検出にある。そのような装置の例は、本出願人による米国特許 No. 5,384,264ならびに EP0公開公報 No. 0560411A2、PCT 出願 No. PCT/GB/00322 および米国特許 No. 4,366,241に記載されている。それらの最も簡単な形態では、そのような装置により、アッセイおよび結果の読み取りを一工程で行うことができる。例えば、液体サンプル（尿など）を吸収性の膜に載せると、その中にある対象の被分析物が対応するリガンドに結合し、結果（すなわち、特定の複合体の生成）が、サンプル装填ゾーンから分離した検出ゾーンにおいて視覚的に示される。

【0003】そのような装置は、典型的には比較的大き

い細胞を含まない（従って、毛管作用などにより試薬含浸膜を容易に通過する）体液のアッセイに対しては十分機能するが、全血などの大きい細胞を含む体液における被分析物のアッセイに対しては適応できていない。その代わりに、全血に存在する被分析物のアッセイは、典型的には、実質的に細胞を含まない血漿または血清画分に對して行われ、従って、サンプルは、アッセイを行う前に赤血球および他の細胞を除く必要がある。

【0004】米国特許 No. 5,304,468に記載の装置は、表向きは、被分析物、特にグルコースをアッセイする前に全血から血漿または血清画分を単離する必要を回避するものである。記載された装置（試験片）は、向かい合うサンプル導入表面および試験表面を含み、後者に試薬を含浸させる。陽性または陰性の結果は、光学的に検出される試験表面での反射率の変化によって示される。開示によれば、反射率の変化の検出は、試験サンプル中の赤血球の存在の影響を受けないので、全血サンプルは、サンプル導入表面に適用してもよい。しかし、結果は反射率の変化で測定されるので、開示された装置を使用してアッセイを行うためには、光学測定装置が必要である。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、アッセイを行う前にサンプル中の細胞から非細胞液体画分を分離する必要なく、細胞含有流体サンプル中の被分析物の一工程アッセイを行うための装置および方法から成る。さらに、本発明は、サンプル中の細胞成分を除くための疎水性フィルムの使用または、それに続く除いた成分をアッセイ装置から除去するための洗浄工程を必要としない。さらに、本発明に従って行われたアッセイの結果は、別の測定装置を使用することなく、また、試験サンプルの反射率に関係なく、視覚的に読み取ることができる。すなわち、本発明によるアッセイを行うには、必要量の試験サンプル（好ましくは、全血）を本発明の装置に導入し、次いで、短時間に装置の検出ゾーンに現れる色の变化などを観察するだけでよい。

【0006】このために、本発明の装置は、試験サンプルを親水性サンプル導入膜に導入する箇所に細胞トラップを含む。該トラップは、好ましくは被分析物サンプル中の細胞の予想される直径より小さい有効直径の孔を有する層状の親水性メッシュであり、これを、サンプル導入膜と流体連絡するように配置する。すなわち、使用に際しては、試験サンプルの流体画分のみが細胞トラップを通過してサンプル導入膜に入る。次いで、サンプル導入膜に入った流体は、その膜を通過して試薬含浸染料ゾーンに入った後、試験および対照ゾーンに入る。本発明の装置の最も好ましい態様では、陽性または陰性の試験結果を誘導するために、視覚的に検出できる特定の染料（金属含有無機化合物のゾルなど）を使用する。

【0007】本発明の装置は、装置の種々の成分を含む

試験片およびカセットなど、適切などんな形状であってもよい。本発明の方法によれば、少量の試験サンプル（好ましくは、全血）をピペットにより、または滴下もしくは他の方法（例えば、指に針を刺して直接接触させる）により、細胞トラップに入れる。サンプルに存在する（分離した細胞成分の膜に結合していない）被分析物と1種以上の特異的リガンドとの結合により、試験結果を示す特定の視覚的パターンが形成される。

【0008】本発明を使用すると、少なくとも1種類の特異的リガンド（結合相手）が公知である（例えば、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体）、流体サンプルに存在するどんな被分析物（例えば、全血中の可溶抗原）も検出することができる。本発明は、特に、感染性および非感染性病原体と関連した、モノエピトープおよびポリエピトープ抗原および抗体ならびに生理学的化合物および薬物の検出に有用である。本発明の装置は、全血サンプルのアッセイで特に使用することができるが、他の液体サンプル、特に、細胞またはそれに匹敵する大きさの他の妨害粒子が存在することが知られているサンプルのアッセイに使用することもできる。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

##### 1. 定義

理解を容易にするために、本明細書全体にわたって下記の定義を適用する。

##### a) 被分析物

1個以上の結合部位（例えば、エピトープ）、すなわち、別の分子または化合物が結合する箇所を含む分子または化合物。

##### b) リガンドおよび結合対

被分析物上の特定の結合部位に結合して「結合対」を形成する分子または化合物。対象のどの被分析物/リガンド結合対も本発明に使用することができる。構造的には、リガンドとして、タンパク質、ペプチド、炭水化物、多糖、核酸、オリゴヌクレオチド、ハプテンおよびそれらの組み合わせが挙げられる。機能的には、リガンドとして、抗体、抗原（例えば、微生物抗原、前立腺特異抗原）、ホルモン（例えば、甲状腺刺激ホルモン）、薬物、酵素、アレルゲンならびにそれらの断片、変異体および組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。当業者であれば、そのようなリガンドおよび対応する結合対には精通しており、または容易に特定することができる。

##### 【0010】c) 試験サンプル

特定のアッセイが特異的である、対象の被分析物を含む疑いのある流体。

##### d) 標識

試験サンプル中の対象の被分析物の有無または濃度範囲を示すためのアッセイで使用される、信号（色の变化など）の形成を直接的または間接的に媒介する分子または

化合物。標識としては、酵素、蛍光体、リボソーム、赤血球ゴースト、ポリマーマイクロカプセル、着色ポリマー粒子（ラテックス）が挙げられ、好ましくは、金属含有化合物のゾルが挙げられる。

#### 【0011】e) 金属標識

金属含有ゾル、すなわちポリマーと混合した、もしくはポリマー核上に被覆した酸化金属、水酸化金属、金属塩、金属もしくは金属含有化合物などの金属または金属化合物の標識。これらの金属標識は、上述した金属または金属化合物ゾルの脱水形態を含むことができ、好ましくは、コロイド状の金の脱水形態を含む。

#### f) 複合体

使用されている文脈に応じて、「複合体」は、被分析物および1種以上のリガンドによって形成される、または標識リガンドおよび固定化リガンドによって形成されるいずれかの多重分子複合体を意味する。サンドイッチ型イムノアッセイでは、例えば次の複合体：アッセイで最初に生成する被分析物／標識リガンド二重型（「第一複合体」）およびアッセイで二番目に生成する被分析物／標識リガンド／固定化リガンド三重型（「第二複合体」）が生じる。

#### 【0012】g) 細胞成分

細胞膜ならびにミトコンドリアおよび核などの細胞内構造を意味する。

#### h) 非細胞画分

その中に存在する被分析物および本発明の装置の細胞トラップに捕獲されなかった細胞成分を含む、試験サンプルの液相を意味する。

#### 【0013】2. 本発明の装置の好ましい態様

本発明の装置は、本発明の材料要素を含むどんな形状または立体配置もとることができるが、装置の好ましい立体配置は、本発明の装置の内部成分を含む試験片およびカセットである。すなわち、本発明の装置は、本明細書では、試験片およびカセット型装置として記載するが、本発明は、これらの特定の立体配置に限定するものと理解されるものではない。

【0014】本発明に従って構成される試験片を図1に示す。図の左側に、細胞トラップ1を、サンプル導入膜3の上にある層状メッシュとして示す。試験サンプルを入れるための細胞トラップ1への通路は、カバー5にある窓4によって得られる。カバー5は、試験片の上部表面全部または一部にわたって延びた疎水性材料の薄層またはフィルムである。カバー5は試験片から省くことができるが、窓4によりサンプルを正確に入れるのを助け、細胞トラップ1を汚染から保護し、細胞トラップ1のサンプル導入膜3からの分離を防ぐ役目がある。すなわち、本発明の試験片にカバー5を含めるのが好ましい。

【0015】カバー5に向かい合うのは、薄い疎水性の基板6である。基板6は、下記の試験片の全ての機能成

分の硬質支持体として、また、流体が試験片から出て装置の底表面を通過するためのバリヤとして作用する。カバー5および基板6として使用するのに適した材料としては、セルロース誘導体、ポリビニル化合物およびポリアクリル化合物ならびに他の固体ポリマーが挙げられ、それらはカバー5および基板6を形成するために使用することができ、または、カバーもしくは基板が異なる材料（紙など）で構成される場合の被覆材として使用することができる。カバー5および基板6の試験片における好ましい位置を図2に示す。

【0016】細胞トラップ1の構造は、図3にさらに詳細に示す。図3に示すように、細胞トラップ1は重複する横断面に配向した多層繊維（繊維6aおよび6bで表す）から成り、メッシュを形成している（重複する繊維の下にある層は幻影で示す）。重複する繊維によって形成される孔は、試験サンプル中の赤血球または他の細胞の予想される直径を越えてはならず、好ましくは該直径未満である。濾過を容易にするために、細胞トラップの上部繊維層の孔の大きさは、下部繊維層における孔の大きさと異なってもよい。本明細書では、細胞トラップのある層における最も小さい孔の大きさを、細胞トラップの有効な孔の大きさとする。ヒトの赤血球の場合、平均直径は7.7 $\mu$ であり、平均の厚さは約2 $\mu$ である。理解を容易にするために、細胞トラップ1で分離すべき細胞は、本明細書では赤血球とするが、理解されるように、本発明は、赤血球を含む試験サンプルでの使用に限定されない。

【0017】図3（他の図とはスケールが異なる）に示すように、細胞トラップ1の各孔（孔7によって表す）の有効サイズは、捕獲される細胞の大きさ（図3で細胞10によって表す）より幾分小さい。各孔の境界を形成する繊維は、試験サンプルに触れても変形しないように、すなわち孔の大きさが拡大しないように強く編みである。細胞を効率的に分離するために、一般的には、細胞トラップ1の有効な孔の大きさが、捕獲すべき細胞の予想される直径より少なくとも10%小さいのが好ましい。本発明の範囲内では、試験サンプルは、異質の細胞集団を含んでいてもよい。そのような場合、有効な孔の大きさは、試験サンプル中の最も小さい細胞の直径より少なくとも10%小さいのが好ましい。また、より小さい孔を使用すると、本発明装置の細胞成分および全細胞の捕獲能を高めることができる。全ての場合において、孔の大きさは、試験サンプルの非細胞流体画分の通過が妨げられて、孔を通してサンプル導入膜3に入ることができないほど小さくあるべきではない。

【0018】当業者であれば理解されるように、試験サンプル中に存在する赤血球または他の細胞は、予想される大きさでない可能性があり、予想よりも小さい場合は、細胞トラップ1の孔を通過することができるだろう。すなわち、細胞トラップ1の捕獲能を高めるために

は、少なくとも2層、好ましくは3層より多くの重複する繊維が一層ごとに横切る方向に積み重なって細胞トラップ1を形成する。

【0019】さらに、図3には均一に重複する繊維を示すが、当業者であれば理解されるように、よりランダムに配向した繊維を細胞トラップ1に使用してもよい。そのような構造では、孔の全てが均一の大きさとはならない。従って、細胞トラップ1に載せた被分析物サンプル中の赤血球が重複した繊維の1層以上を通過する可能性がある。細胞トラップ1の重複した繊維の各層は、表面層で捕獲されない細胞がトラップのより深い層で捕獲されるよう、横断するように配向させるべきである。そのためには、細胞トラップ1は、少なくとも3層の重複する繊維を含むことが好ましい。試験サンプルの非細胞流体画分がより容易に細胞トラップ1を通過してサンプル導入膜3にしみ込むようにするために、細胞トラップ1は、好ましくは、全厚が0.1mm～3mmである。細胞トラップ1の窓4（図1）から試験サンプルを入れるために利用できる表面積は、試験サンプルの体積および入れる方法に応じて変わり、本発明によるほとんどの全血サンプルの試験の場合、約3mm<sup>2</sup>～25mm<sup>2</sup>の表面積が適切であると予想される。

【0020】細胞トラップ1の繊維は、赤血球を捕獲するための特定の電荷または個々の厚さを有する必要はない。しかし、被分析物サンプルの非細胞画分が細胞トラップ1を通過してサンプル導入膜3に入るのを助けるために、細胞トラップ1は、流体がトラップの孔をしみ通るのを妨げられないように、幾分か親水性であるのが望ましい。記載した特徴を有する繊維材料であればいずれも細胞トラップ1として使用することができる。層状のナイロンまたはセルロースフィルター材料（ニトロセルロースなど）の完成したパッドまたは細片を使用すると便利である。

【0021】図1に戻ると、サンプル導入膜3は細胞トラップ1の下に位置し、細胞トラップ1と流体連絡している。本明細書において、「流体連絡」は、互いに接触しているが、必ずしも固定している必要はない構造を意味する。好ましくは、サンプル導入膜3は細胞トラップ1よりも多孔性であり、また、細胞トラップ1からの流体の一方の流動を容易にするために幾分かより親水性である。あるいは、細胞トラップ1を形成するために使用される材料によってサンプル導入膜3を形成してもよい。

【0022】図1に示すように、サンプル導入膜3は完全に細胞トラップ1のすぐ下に置く。しかし、図1の試験片の構造全体が記載されていると、当業者であれば、サンプル導入膜3は、細胞トラップ1のすぐ下に、試薬含浸膜20に向かう流動方向に対して斜めに置き得ることが認識される。本発明装置の全ての態様において、サンプル導入膜3および細胞トラップ1は、流体連絡の状

態にあるべきである。

【0023】サンプル導入膜3が細胞トラップ1よりも高度な多孔性を有する別の材料である場合は、吸収性、多孔性、吸湿性または他のどんな親水性材料も膜の形成に使用することかできる。そのような材料の例は周知であり、強く織った紙、ニトロセルロース、繊維ガラスおよび多孔性プラスチック（高分子量ポリプロピレンおよびアクリロニトリルなど）が挙げられる。好ましくは、選択される材料の多孔性が、2、3秒で約20～40μlの血液の流体成分を吸収するのに十分であるようにする。本発明の試験片を使用する方法に関して後にさらに記載するように、好ましくは、アッセイ中にサンプル導入膜3の近接端に緩衝液を載せて、比較的少量の被分析物サンプルが試験片の種々の膜を進むのを助ける。このために、緩衝液ゾーン13を図1に幻影で示す。

【0024】理解されるように、緩衝液は、本発明の装置を使用して行うことができる全てのアッセイの実施に重要というわけではない。すなわち、全ての流体流動を、試験サンプルから得られる液体によって付与することもできる。しかし、緩衝液を使用すると、一般に、必要な試験サンプルの量が最少になり、アッセイをより速く完了することができる。

【0025】サンプル導入膜3は、染料含浸膜15と流体連絡している。特に、1種以上の標識リガンド（例えば、抗体または抗原）は、可溶アミノシランまたは当業者に周知の他の適する結合手段の使用によって、多孔性、吸収性または吸湿性膜に結合する。好ましい膜材料は、例えばLydall, Inc. から'MANNIWEB'または'MANNIGLAS'の商品名で市販されているような繊維ガラスである。他の適する材料としては、ポリエチレンまたはニトロセルロースのパッドおよび細片が挙げられ、これらの材料にリガンドを結合させる手段は周知である。あるいは、染料含浸膜15が、サンプル導入膜3の一部であってもよい。しかし、標識したリガンドのサンプル導入膜3への逆流を最少にするために、染料含浸膜15は別個の構造体であるのが好ましく、最も好ましくは、一般に、下記に記載する試薬含浸膜の方向に配向した繊維を含む繊維材料（上述した繊維ガラスなど）である。

【0026】標識したリガンドは、周知の手段に従って調製される。視覚的に明らかな反応を生じるために、金属含有ゾルの標識が好ましく、コロイド状の金またはセレンの標識が最も好ましい。適する製品の例としては、Janssen Life Sciences Productsから市販されているコロイド状の金がある。これらのコロイド状金属は、さらに試薬を添加することなく、視覚的に特徴的なパターンを生じる。しかし、蛍光体（フルオレセインなど）および酵素（米国特許 No. 4,275,149（参考文献として本明細書に含まれている）で特定される酵素など）を使用することもできる。試験サンプルと標識したリガンドとの接触を最大にするために、後者の占める領域（試験ゾー

ン21および対照ゾーン22)は、その膜の一方の側から他方の側に伸びるのが好ましい。

【0027】第一の固定化リガンドは、試験ゾーン21(染料含浸膜15に近接して置かれる)の試薬含浸膜20上で固定化される。これが、サンプル試験領域の位置となる。試薬含浸膜20は好ましくは、試験片の寿命および試験で生じる視覚的反応の明確さを高めるためにゼラチンで被覆した多孔性細片である。第一の固定化リガンドは、周知の手段、例えば共有結合または不溶タンパク質被覆表面への付着など(例えば、米国特許 No. 4,200,690(参考文献として本明細書に含まれている)参照)によって試薬含浸膜20に固定して結合させることができる。

【0028】好ましくは、第一の固定化リガンドが占める領域は、試験ゾーン21において試薬含浸膜20の端から端に伸びた棒または楕円形の形を有する。棒などの単純で、一方向の配置を使用することにより、より複雑な形(「+」または「-」など)が特定の結果を示すために十分形成されているかどうかを調べる必要性が回避される。さらに、簡単な形状を使用することにより、立ち上がり縁効果の影響が克服され、結果の視覚的解釈がより容易になる。

【0029】第二の固定化リガンドは、染料含浸膜15に遠い対照ゾーン22に位置する。第二の固定化リガンドは、標識したリガンドの少なくとも一つに対して特異的な親和性を有するべきである。第二の固定化リガンドの固定化は、上記の第一の固定化リガンドに関して記載した方法と同様にして行うことができる。比較を容易にするために、対照ゾーン22の形状および向きは、試験ゾーンの形状および向きと同様にすべきである。当業者であれば理解されるように、試薬含浸膜20上の試験ゾーン21および対照ゾーン22の位置を逆にして、前者が染料含浸膜15に近く、後者が近接するようにしてもよい。

【0030】吸収性パッド23は、試薬含浸膜20と流体連絡し、過剰の流体の貯蔵器として、および試薬含浸膜20に沿った一方向流体流を付与するためのポンプとして作用する。後者のためには、吸収性パッド23が好ましくは、試薬含浸膜20とその対照ゾーン22に遠い端で重複する。当業者であれば理解されるように、本発明のいくつかの態様は、吸収性パッドを含まなくてもよい。その機能は、例えば、試薬含浸膜20の末端を延ばすことにより満たすことができる。しかし、最適に行うためには、吸収性パッドを含む態様が好ましい。

【0031】試験片の使用に対する指示は、試験片のカバーまたはパッケージに印刷することができ、および/または印刷物に印刷して試験片とともにパッケージする。好ましくは、試験片は、試験片、使用説明書、乾燥剤の包み、試験サンプルを計量するための毛管装置、緩衝液、緩衝液を計量するためのピペットならびに被分析

物サンプルを試験片に載せた後に緩衝液および試験片の緩衝液導入ゾーンを入れるカップなどの反応チャンバーで構成されるキットの一部である。アッセイ法を行う際に使用するそのようなキットの構成物品(例えば、印刷された使用説明書は除く)は、好ましくは、1つ以上の密閉したパッケージ(ホイルの包みなど)に入れて密封すべきである。

### 【0032】3. 別の態様：容器の装置

あるいは、本発明の試験片に関して記載した成分は全て(カバー5および基板6を除く)、図4に示すように、固体プラスチックのベース26にしっかりと適合する固体プラスチックカバー25で構成される流体を通さないハウジングに入れることができる。試験サンプルを細胞トラップ1に入れるための穴27は、カバー25に置く。好ましい態様では、緩衝液を装置に入れるための穴28もカバー25に置く。しかし、試験サンプルおよび緩衝液を同じ穴を通して入れる他の態様も本発明の範囲内である。試薬含浸膜20を見るための表示穴29もカバー25に置く。

【0033】本発明で使用するための特に好ましいカセット設計は、米国特許 No. 5,384,264に開示されており、該特許の明細書はその範囲で参考文献として本明細書に含まれている。No. 5,384,264 特許および本明細書により構成されるカセット装置を図5の分解図で簡単に示す。これを見ると、ベース26は明瞭に2つの領域に分かれることが分かる。第一は底面31、側壁32およびスロープ33によって定義される窪み30である。好ましい態様では、垂直のバー34(図示していない)がカバー25から窪み30にスロープ33とちょうど隣接して下方に伸びており、染料含浸膜15がスロープ33に沿って正しい位置に保持される。

【0034】基板26の第二の領域は、スロープ33の上部で始まり、窪み30に平行に離れて伸びた台36を形成する拡張表面から成る。好ましくは、流体の溝40を、過剰の液体用の別の貯蔵器として、台36の近接端に含む。台36は、スロープ33から基板26の長さだけ張り出してもよいし、または、基板26から離れた端の少し手前で止まって、過剰の液体を集めるための流体の第二の溝41のための場所を残してもよい。試薬含浸膜は、ほぼ台36(表示穴29の向かい合う位置の下)の長さに沿って配置し、吸収性パッド23は、台36の離れた端に位置して、流体の溝41の上に張り出してもよい。乾燥剤の錠剤は流体の溝41に入れることができる。乾燥剤は、装置の貯蔵期間中の試薬の保存に必要な低い湿度条件を提供する。あるいは、乾燥剤の錠剤または包みを密閉した保護ポーチに入れて装置に含めることもできる。

### 【0035】4. 本発明装置の使用方法

試験サンプルは、胎児、新生児、少年少女または成人から得た血液、尿、リンパ液、腹腔内液、粗組織抽出物ま

たはホモジネートなどのいずれかの体液を表すが、好ましくは全毛細血管血または静脈血である。ほとんどの適用に対して、本発明での使用には、約5 $\mu$ l～50 $\mu$ lの試験サンプルで十分であり、好ましくは20 $\mu$ l～30 $\mu$ lである。

【0036】本発明の方法は、試験サンプルを本発明に従って構成した装置（試験片またはカセット）の細胞トラップに適用することにより行う。細胞成分を含む（または含む疑いのある）試験サンプルに対しては、細胞画分と非細胞画分との分離に十分な時間、通常は約60～120秒を与える。上記工程が完了した後、緩衝液を装置の緩衝液ゾーンまたは穴を通して添加する。

【0037】添加する緩衝液の量は、試験サンプルが洗い流されるのを避けるように制限しなければならない。一般に、試験サンプルを試験装置の膜に沿って進めるための使用には、5滴未満（好ましくはたっぶり3滴）の緩衝液で十分である。適する緩衝液としては、試験サンプルまたはその成分と反応しない、薬剤的に許容される水性緩衝液が挙げられる。当業者であれば、そのような緩衝液に精通しているだろうし、または容易に確認することができ、例えば、生理的食塩水、リンゲル溶液などが挙げられる。緩衝液は、緩衝液用の穴に滴下することができ（カセット型装置の場合）、または必要体積の緩衝液を反応容器（カップ）に入れた後、試験片の緩衝液ゾーンをその中に漬漬することにより添加する（本発明の試験片の態様の場合）。試験サンプルおよび緩衝液は共に、装置に添加するときは、室温（約15～30℃）にすべきである。

【0038】試験サンプルおよび緩衝液を添加すると、約10分までに結果を読み取ることができる。緩衝液の使用を必要としない態様では、結果は、試験サンプルの非細胞画分が試験装置の膜を通る流速に応じてよりゆっくり展開すると考えられる。緩衝液を使用しない場合、結果は、バンドが対照ゾーンに現れるのとはほぼ同時に読み取られる。バンドが現れない場合、または対照のバンドが明確でないか、完全には形成されない場合、そのアッセイは、試験サンプル中の被分析物の有無を示すことができないとみなし、再び行うべきである。

【0039】特に、サンドイッチ型アッセイでは、試験サンプル中に対象の被分析物があるならば、染料ゾーンで標識リガンドに結合して、第一の複合体を形成する。第一の複合体および未結合の標識リガンドは試験サンプルと混合され、毛管作用（'wicking'）によって染料含浸膜（染料ゾーン）から装置の試薬含浸膜と一緒に運ばれる。

【0040】サンプルは試薬含浸膜を通過し、第一の複合体があるならば、試薬含浸膜上に固定化された未標識リガンドと接触して共に結合し、標識リガンド-被分析物-固定化リガンドの第二の複合体を形成する。第二の複合体が形成されると、目に見える色パターンが試験ゾ

ーンに現れる。試験サンプル中の被分析物に結合していない標識リガンドは、wickingによって対照ゾーンに移動し続け、そこで固定化されたりリガンドと接触する。標識リガンドは、対照ゾーンで固定化リガンドに結合して第三の複合体を形成し、こうして対照ゾーンに捕獲される。本発明の範囲内では、対照ゾーンで複合体を形成する標識リガンドが第一および第二の複合体を形成する標識リガンドと同じであってもよく、または、異なる標識リガンドであってもよい。対照ゾーンで固定化されたりリガンドは、第三の複合体を形成するための標識リガンドに対して特異的な親和性を有するべきである。第三の複合体の生成は、対照ゾーンでの目に見えるパターンによって示される。

【0041】サンドイッチ型アッセイ法の他に、他のアッセイ法を本発明の装置で実行することができる。これらの方法としては、競合および阻害アッセイが挙げられる。競合アッセイでは、被分析物および標識リガンドが同じ親和特性を有し、固定化リガンドとの結合に対して競合する。すなわち、被分析物の不在下では、試験ゾーンにおけるパターン（例えば、バンド）の強度が最大である。存在する場合は、被分析物が固定化リガンドに結合し、従って標識リガンドが試験ゾーンに捕獲されるのを防ぐ。すなわち、試験バンドの強度は、試験サンプル中の被分析物の濃度に応じて低下する。

【0042】阻害アッセイでは、試験ゾーンにおける被分析物および固定化リガンドが標識リガンドに対して親和性を有する。被分析物の不在下では、標識リガンドが固定化リガンドによって捕獲され、目に見えるパターンが試験ゾーンに生じる。存在する場合は、被分析物が標識リガンドに結合し、従って、試験ゾーンでの固定化リガンドへの結合が防止される。その結果得られる試験バンドの強度は、試験サンプル中の被分析物の濃度に応じて低下する。

【0043】本発明の範囲内の全てのアッセイ法は、試験結果が2つの様式、すなわち視覚的確認様式および比較様式のうちの一つで読み取れるように設計することができる。視覚的確認様式では、陽性または陰性の結果（ある濃度以上の被分析物の有無）を、試験ゾーンにおけるある種のパターンまたは色の可視性によって求める。対照ゾーンでのパターンは、装置の機能性の内部コントロールとしてのみの役割を果たす。比較様式では、陽性または陰性の結果が、試験ゾーンおよび対照ゾーンで生じたパターンの強度を視覚的に比較することにより得られる。すなわち、後者の場合、対照ゾーンのパターンは、内部定性コントロールとして、および比較様式で結果を読み取るための参照標準としての両方の役割を果たす。

【0044】視覚的確認様式での試験結果の例を図6および図7に示す。この場合、図6に示すように、陽性の結果は、試験ゾーン21および対照ゾーン22において



同じ水平のバーが生成することにより示される。これに対して、陰性の結果は、図 7 に示すように、対照ゾーン 22 にのみ現れる区別可能な水平バーによって示される。

【0045】他の対照または比較の結果の信号を与えることもでき、例えば、無効結果が得られたかどうかを当業者に周知の同様の手段によって示す信号がある。(例えば、欧州特許出願 No. 8611367.0 (公開公報 No. 0217 403 A2) 記載の信号系参照)。本発明は、広範囲の被分析物の検出に用いる装置および方法に適用できる。被分析物の種類の例として、次のものが挙げられる。すなわち、タンパク質およびタンパク質誘導体(抗体、免疫グロブリン、ホルモン、酵素およびペプチドなど)；感染性物質(細菌、ウイルス、真菌類、マイコプラズマ、寄生虫ならびにそれらの産物および成分など)；薬物(治療薬および乱用薬物など)；および腫瘍マーカーである。特定の例としては、HIV に対する抗体、H. Pylori に対する抗体、C型肝炎ウイルスに対する抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、エストラジオール、甲状腺刺激ホルモン、前立腺特異抗原、B型肝炎表面抗原、ミオグロビンおよび免疫グロブリンEが挙げられる。

#### 【0046】

【実施例】本発明を説明する実施例を以下に示すが、以下の実施例は本発明の範囲を制限するものではなく、本発明は特許請求の範囲によって定義される。実施例では、標準的略号(例えば、時間は「h」)および測定単位(例えば、ミリリットルは「ml」)を使用する。

#### 【0047】実施例 1

##### ヒト血液中の抗-細菌抗体の検出

全毛細血管血の試験サンプルを、指先に針を刺すことによる従来の試料収集法を使用してヒト成人から得た。約 20  $\mu$ l の血液を、H. pylori に対するヒト抗体の全てのイソタイプと反応性のある(H. pylori の)ポリエピトープ微生物抗原試薬を含むように本発明に従って構成した試験片の細胞トラップの表面と直接接触させることにより添加した。90秒後、たっぷり3滴の緩衝液(生理的食塩水)を、3滴の緩衝液を含むカップに試験片を浸すことにより、試験片の緩衝液ゾーンに添加した。試験片に添加した試験サンプルおよび緩衝液の添加時の温度は共に、約 15 ~ 30  $^{\circ}$ C であった。

【0048】緩衝液を添加した後、試験片を、緩衝液のカップに 10 分間、室温で放置した。着色した2つのバンドが試験片の検出ゾーンおよび対照ゾーンに認められた。これは、試験サンプル中の抗-H. pylori 抗体に対して陽性(検出ゾーンにおける着色バンドの出現によって示される)であることを示す適正な試験(対照ゾーンにおける対照バンドの出現によって示される)である。次いで、試験片および未使用の試験サンプルを、従来の生物学的廃棄物処理法に従って処分した。

#### 【0049】実施例 2

##### 全血中の前立腺特異抗原の検出

全静脈血の試験サンプルを、従来の血液試料収集法、すなわち脈管内注射器を使用して、ヒト成人から得た。約 20  $\mu$ l の試験サンプルを、ヒト前立腺特異抗原に対して特異的なモノクローナル抗体試薬を含むように本発明に従って構成した容器装置の細胞トラップ上にピペットで添加した。90秒後、たっぷり3滴の緩衝液(生理的食塩水)を、ピペットによって細胞トラップに滴下した。試験片に添加した試験サンプルおよび緩衝液の添加時の温度は共に、約 15 ~ 30  $^{\circ}$ C であった。

【0050】緩衝液を添加した後、装置を、平らで水平な表面上に 10 分間、室温で放置した。着色した2つのバンドが試験片の検出ゾーンおよび対照ゾーンに認められた。これは、試験サンプル中のヒト前立腺特異抗原に対して陽性(検出ゾーンにおける着色バンドの出現によって示される)であることを示す適正な試験(対照ゾーンにおける対照バンドの出現によって示される)である。次いで、装置および未使用の試験サンプルを、従来の生物学的廃棄物処理法に従って処分した。

【0051】本発明を十分に記載したが、記載した態様に対する改変は、当業者にとって明らかになるであろう。そのような改変は全て、本発明の一部であり、特許請求の範囲内であるとみなされる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の試験片の分解図である。

【図 2】本発明の試験片の斜視図である。

【図 3】細胞トラップ 1 を含む層を通る図 1 の 3-3 で切断した拡大断面図である。

【図 4】本発明のカセット装置の斜視図である。

【図 5】本発明のカセット装置の分解図である。

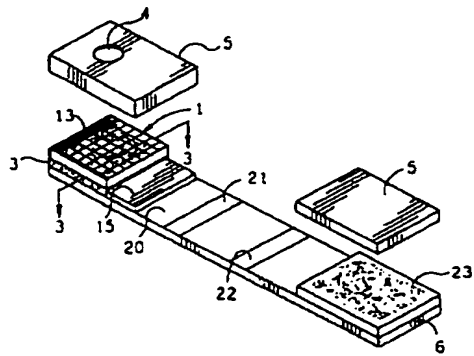
【図 6】サンプル中の被分析物の存在に対して試験ゾーンに視覚的結果を示す、本発明の試験片(カバーはない)の斜視図である。

【図 7】サンプル中の被分析物の存在に対して試験ゾーンに別の視覚的結果を示す、本発明の試験片(カバーはない)の斜視図である。図において、同じ番号は同じ要素を示す。

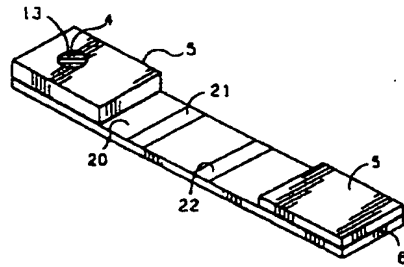
#### 【符号の説明】

- 1 細胞トラップ
- 3 サンプル導入膜
- 4 窓
- 5 カバー
- 6 基板
- 15 染料含浸膜
- 20 試薬含浸膜
- 21 試験ゾーン
- 22 対照ゾーン
- 23 吸収性パッド
- 40 流体の溝

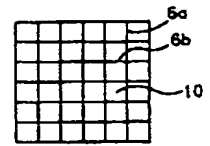
【図1】



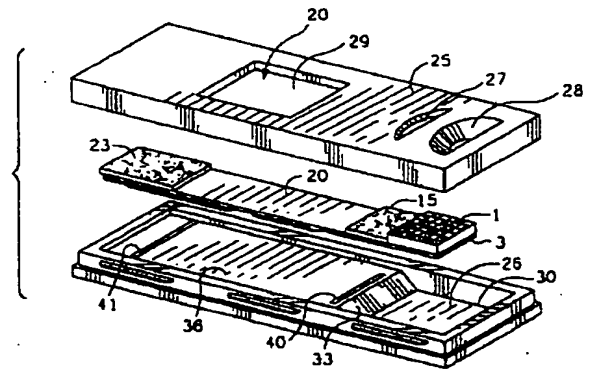
【図2】



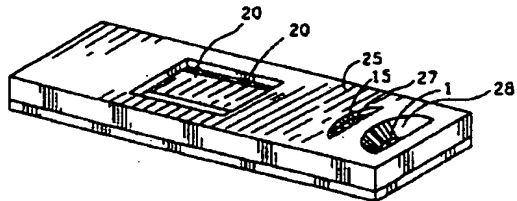
【図3】



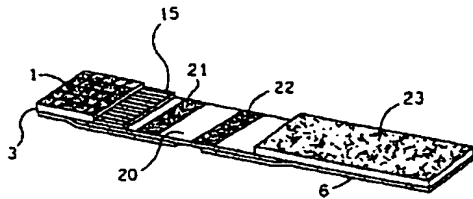
【図5】



【図4】



【図6】



【図7】

